

Toni Vitasović

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek

Prirodoslovno-matematički fakultet

Sveučilište u Zagrebu

Kokristali farmakološki aktivnih tvari

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Dominik Cinčić

Zagreb, 2016.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	25. srpnja 2016.
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	16. rujna 2016.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	22. rujna 2016.

Mentor rada: doc. dr. sc. Dominik Cinčić

Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak	v
§ 1. Uvod	7
§ 2. Kristalne forme farmakološki aktivnih tvari	8
2.1. Soli, solvati i kokristali.....	8
2.2. Polimorfija.....	9
2.3. Amorfija	11
§ 3. Kokristali farmakološki aktivnih tvari	13
3.1. Definicija i klasifikacija kokristala farmakološki aktivnih tvari.....	13
3.2. Načini dobivanja	14
3.3. Izučavanje strukture	16
3.4. Fizikalno-kemijska svojstva	17
3.4.1. Talište kokristala	18
3.4.2. Stabilnost kokristala	19
3.4.3. Topljivost kokristala	21
3.4.4. Intrinzično otapanje kokristala.....	23
3.4.5. Bioraspoloživost kokristala.....	24
3.5. Problemi, izazovi i razvoj.....	25
3.5.1. Napredak u razumijevanju osnova nukleacije.....	25
3.5.2. Proizvodnja većih količina kokristalnog materijala.....	27
3.5.3. Kontinuirano procesiranje	29
§ 4. Zaključak.....	31
§ 5. Literaturna vrela	32

§ Sažetak

U zadnjih desetak godina kokristali su postali kristalni materijal od značajnog interesa u farmaceutskoj industriji. Takvi oblici višekomponentnih supramolekulskih sustava građeni su od nenabijenih farmakološki aktivnih molekula i farmakološki prihvatljivih molekula sučinitelja (*koformera*), koji su u kristalu povezani međumolekulskim privlačnim silama poput vodikovih i halogenskih veza, Keesomovih i Londonovih sila itd. Uz sintezu iz otopine ili taline, u vrlo pogodne i efikasne načine dobivanja kokristala ubrajaju se mehanokemijske tehnike koje podrazumijevaju mljevenje potpomognuto malom količinom tekućine i suho mljevenje, te tehnike koje koriste pare otapala (ubrzano starenje i sinteza potpomognuta parama). Kokristalizacija je korisna u farmaceutskoj industriji jer omogućava promjenu fizikalno-kemijskih svojstava farmakološki aktivnih tvari bez mijenjanja njihove molekulske strukture. Promjenom kristalne strukture željenog spoja mogu se modificirati svojstva važna za farmakološki aktivne tvari kao što su topljivost, brzina otapanja, bioraspoloživost, termička stabilnost i higroskopnost. Uz to, postoje određeni problemi i izazovi u znanosti i industriji koji se javljaju pri kristalizacijskim postupcima, a to su ponajviše problemi nukleacije, polimorfije i skaliranja.

§ 1. Uvod

Farmakološki aktivne tvari, API (eng. *Active Pharmaceutical Ingredients*) čine komponentu svakog lijeka koja je 'aktivna'. Reakcije i rezultati djelovanja farmakološki aktivnih tvari se razlikuju od lijeka do lijeka ovisno o njihovom sastavu i dozi. To su u pravilu organske molekule, organski makrosustavi, koji utječu na ciljano mjesto u organizmu, odnosno specifično interagiraju sa molekulom od interesa imunološkog, probavnog, živčanog, limfnog ili dišnog sustava, krvotoka ili nekog vrsta tkiva (kosti, mišići, koža). Takvi spojevi mogu postojati u sva tri agregacijska stanja: krutom, tekućem i plinovitom.

U farmaceutskoj industriji su od posebnog interesa i predmet mnogih istraživanja farmakološki aktivne tvari koje kristaliziraju (čvrste tvari). Postoji značajna poveznica između kemije čvrstog stanja i farmaceutske znanosti. Većina svojstava organskih molekula u krutom stanju, kao što su topljivost, stabilnost u otopini, mogućnost tabletiranja, otpornost na temperaturne promjene te stabilnost u vlažnim uvjetima uvelike ovisi o njihovoj strukturi na molekulskoj i supramolekulskoj razini. To se odnosi na kristalnu strukturu, odnosno na veličinu čestica i njihovu morfologiju. Zbog prethodno navedenog, jedan od glavnih ciljeva farmaceutske industrije jest razvoj novih strategija i metoda kojima bi se moglo utjecati na svojstva farmakološki aktivnih tvari u čvrstom stanju. To se može postići modificiranjem prostornog rasporeda i povezanosti molekula u samoj krutini, kao npr. pripravom amorfnog materijala, stvaranjem novih polimorfa, solvata, soli i, u zadnje vrijeme, kokristala.¹

§ 2. Kristalne forme farmakološki aktivnih tvari

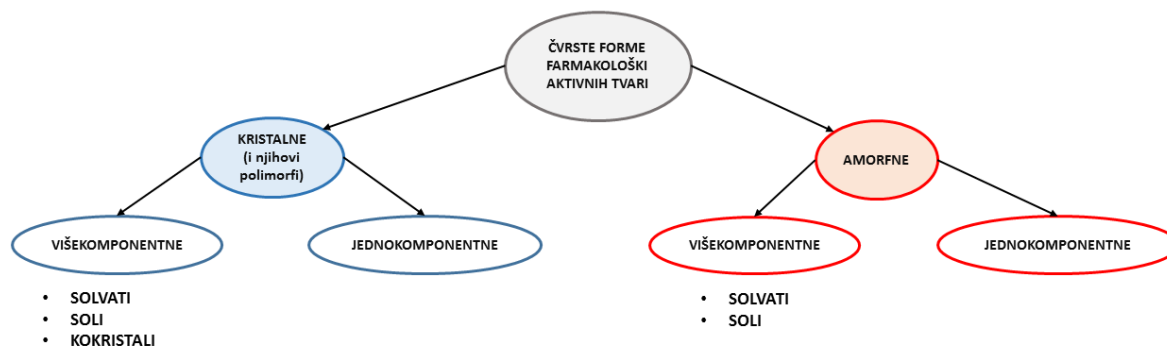
U razvoju novih farmakološki aktivnih tvari od velike je važnosti istraživanje i ispitivanje najpogodnije kristalne forme lijeka. To uključuje istraživanje mogućih polimorfnih i amorfnih formi te izučavanje mogućnosti pripreve soli, kokristala i hidrata/solvata.

U prošlosti se smatralo kako jedna tvar može kristalizirati samo na jedan način. No, tijekom posljednjih pet desetljeća taj se pogled na kristalizaciju bitno promijenio. Dokazalo se da, promjenom uvjeta u kojima se kristalizacija odvija, jedna tvar može kristalizirati u više različitih kristalnih formi, a svaka kristalna forma može imati drugačija fizikalno-kemijska svojstva. Iz tog razloga istraživanje polimorfije, različitih kristalnih formi kako organskih tako i anorganskih spojeva, ima velik utjecaj na temeljne i primijenjene znanosti (medicinu, farmaceutsku industriju, prehrambenu industriju, industriju eksploziva, pigmenata itd.).²

2.1. Soli, solvati i kokristali

Za većinu farmakološki aktivnih tvari postoji više različitih pogodnih i nepogodnih kristalnih formi koje se mogu dobiti na različite načine. Njih je potrebno dobro izučiti tijekom postupka razvoja potencijalnog lijeka. Odabir optimalne kristalne forme API-a je važan za procesiranje, primjenu lijeka i pravnu zaštitu (pitanje intelektualnog vlasništva).³

Soli, solvati i kokristali pripadaju u višekomponentne molekulske kristale (Slika 1.), a razlikuju se po vrsti molekula od kojih se kristal sastoji. Kokristali i solvati se uvijek sastoje od nenabijenih molekula, dok se soli sastoje od nabijenih. Prema strogoj definiciji glavna razlika između solvata i kokristala je ta što je barem jedna komponenta koja ulazi u sastav solvata pri sobnoj temperaturi tekućina (odnosno otapalo), dok su kod kokristala sve komponente koje ulaze u njegov sastav pri sobnoj temperaturi čvrste tvari.³



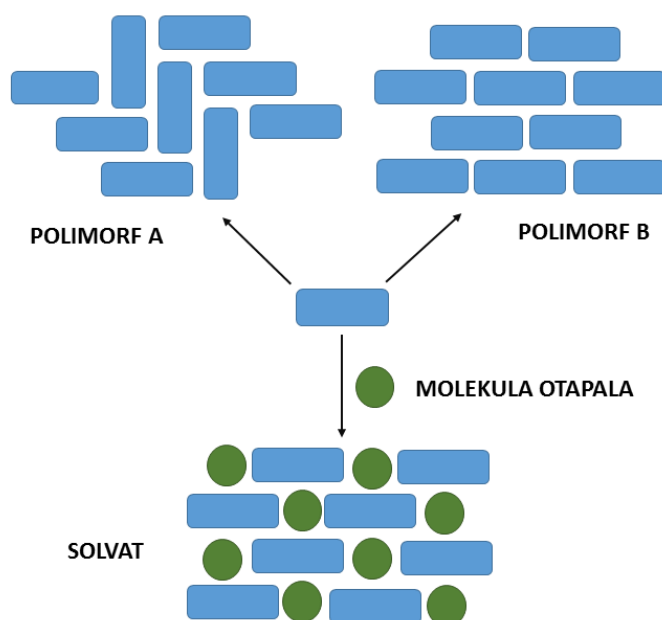
Slika 1. Podjela čvrstih formi farmakološki aktivnih tvari.³

Zajedničko svim višekomponentnim kristalima (solima, kokristalima, solvatima itd.) jest činjenica da su njihova svojstva određena međumolekulskim silama. U sustavima u kojima nema specifičnih interakcija molekule su međusobno povezane disperznim (Londonovim) silama te se u kristalu slažu na najgušći način s obzirom da su sile koje ih povezuju kratkog doseg. Također, u sustavima kod kojih se interakcije mogu definirati između usmjerenih i disperznih interakcija, a u kojima molekule posjeduju permanentni električni dipolni moment, molekule su povezane dipolnim interakcijama. Nadalje, od usmjerenih interakcija najizraženije su vodikove veze i halogenske veze. Kada se u obzir uzmu organske molekule najznačajnije su upravo vodikove veze, ali u posljednjih dvadesetak godina i halogenske veze.^{2,3}

2.2. Polimorfija

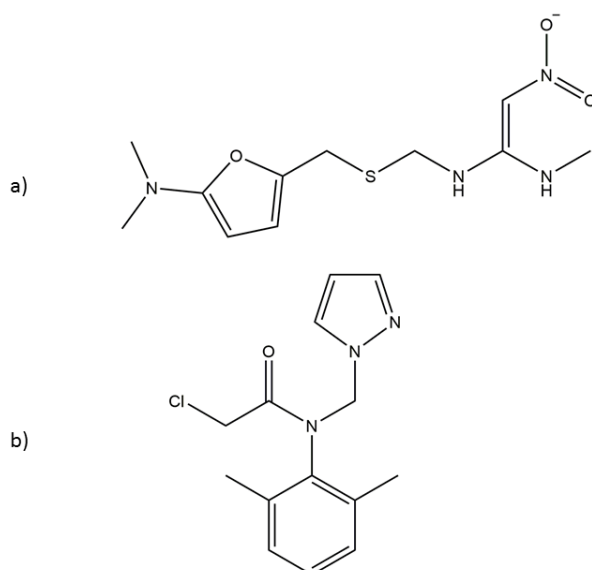
Polimorfizam (grč. *polys* - višestruko, *morfé* - oblik) označava pojam kristalizacije čvrste tvari u više kristalnih formi, odnosno polimorfa. Postoji nekoliko vrsta polimorfije, a kod farmakološki aktivnih tvari najčešće se javljaju tautomerna polimorfija, konformacijska polimorfija i polimorfija pakiranja (Slika 2.).² Pod pritiskom problema intelektualnog vlasništva, istraživanje i inovacija polimorfnih formi kristalnih materijala postali su bitan zadatak znanosti i industrije. Primjeri na kojima se može ilustrirati važnost tog zadatka su farmakološki i agrokemijski spojevi gdje upotrebljivost aktivnih molekula uvelike ovisi o njihovoj topljivosti i bio-raspoloživosti. Navedena i ostala fizikalno-kemijska svojstva mogu se bitno razlikovati između različitih kristalnih oblika iste aktivne molekule. Nadalje, istraživanje

polimorfije i polimorfnih formi je od velike važnosti u kemiji boja, eksploziva, u nutricionizmu i općenito svim područjima kemije čvrstog stanja.^{2,4}



Slika 2. Nastajanje polimorfa i solvata iz iste građevne jedinice.⁵

Kao najpoznatiji primjeri važnosti polimorfije u farmaceutskoj industriji mogu se spomenuti ranitidin hidroklorid (smanjuje stvaranje želučane kiseline) (Slika 3.) i pravni spor oko njegova dva polimera između dvije američke farmaceutske kompanije Glaxo i Novopharm, te ritonavir (inhibitor HIV-proteaze) i problemi njegova dva polimera kojim se bavila tvrtka Abbot Laboratories. Kao izvrstan primjer polimorfije višekomponentnih sustava u agronomiji je herbicid metazaklor (Slika 3.) koji postoji u pet različitih polimorfa od kojih su dva vrlo nestabilna, dok se ostala tri ponašaju kao enantiotropi u malom temperaturnom okviru. Od ostalih dobrih primjera istraživanja polimorfije u industriji mogu se spomenuti dimorfizam 2,4,6-trinitrotoluen-a (poznatiji kao TNT) i pigment kinakridon koji postoji u četiri kristalna oblika.^{2,6}



Slika 3. Strukturna formula rantidina (a) i metazaklora (b).

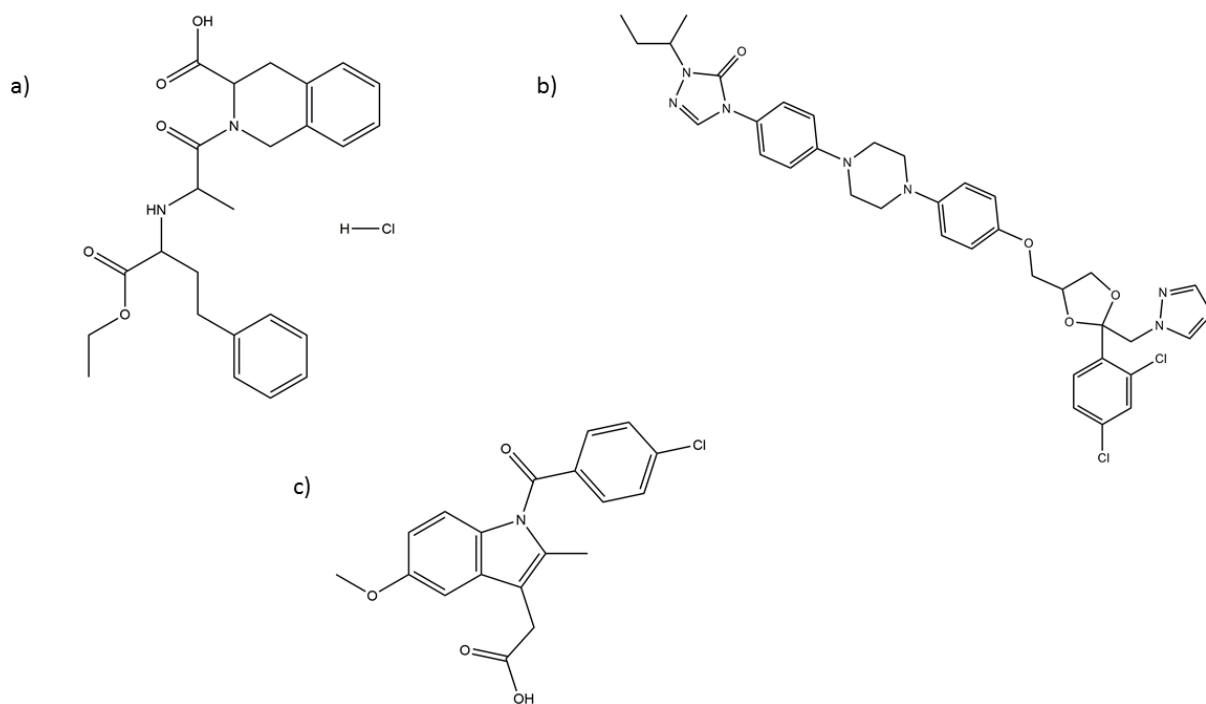
2.3. Amorfija

Uz pojavu polimorfije farmakološki aktivnih tvari usko je vezana i pojava amorfije. Amorfne forme su termodinamički metastabilne što je rezultat nereda unutrašnje strukture na molekularnoj razini. Usporedno s uređenim kristalnim fazama, amorfne forme posjeduju veću molekularnu pokretljivost što uzrokuje veću topljivost i oralnu raspoloživost. S druge strane, smanjenje u kemijskoj i fizikalnoj stabilnosti lijeka zahtijeva strože uvjete proizvodnje i skladištenja.^{6,7}

Amorfne forme posjeduju veću slobodnu energiju od kristalnih formi, što ukazuje na to da amorfne forme običavaju prelaziti u kristalne forme. Kristalizacija amorfnih materijala je olakšana pak njihovom visokom higroskopnošću jer adsorbirana voda pomaže u povećanju molekularne pokretljivosti. Valja naglasiti da ne postoji nagli prijelaz između amorfne i kristalne forme, već je on popraćen pojavom djelomično kristalne faze.⁶

Male razlike između pojedinih amorfnih faza neke farmakološki aktivne tvari (npr. razlika u načinu dobivanja) potiču uvođenje pojma poliamorfizma. Poliamorfizam je dobro definiran i poznat u anorganskoj kemiji (amorfni silikoni), ali u dosadašnjem istraživanju farmakološki aktivnih tvari nije pronađena pojava poliamorfizma. Usprkos tome neki lijekovi se ipak pojavljuju u amorfnim formama, to su npr. kvinapril hiroklorid (lijek protiv astme),

itrakonazol (lijek protiv gljivica) i indometacin (nesteroidni protuupalni lijek) (Slika 4.). API komponente u amorfnom obliku dodatno mogu biti stabilizirane odabranim dodacima kao npr. PVP (polivinilpirolidon), trehaloza, sorbitol itd.^{6,7}



Slika 4. Strukturna formula kvinapril hiroklorida (a), itrakonazola (b) i indometacina (c).

§ 3. Kokristali farmakološki aktivnih tvari

3.1. Definicija i klasifikacija kokristala farmakološki aktivnih tvari

Ideja korištenja kokristala farmakološki aktivnih tvari je relativno nova, no većina farmaceutskih kompanija se aktivno bavi istraživanjem njihovog dobivanja te ispitivanjem njihovih fizikalnih svojstava. To se može primijetiti porastom broja patenata u zadnjih nekoliko godina koji zaštićuju upotrebu kokristala kao optimalne kristalne forme lijeka. Zbog navedenih razloga bilo je potrebno otvoriti pitanje definicije i klasifikacije kokristala farmakološki aktivnih tvari kako bi se olakšala upotreba tog termina, i kako bi se riješila dvojba oko sličnosti pojma soli i kokristala.^{3,7} U prosincu 2011. godine FDA agencija (eng. *Food and Drug Administration*) je objavila prijedlog definicije i klasifikacije kokristala farmakološki aktivnih tvari.

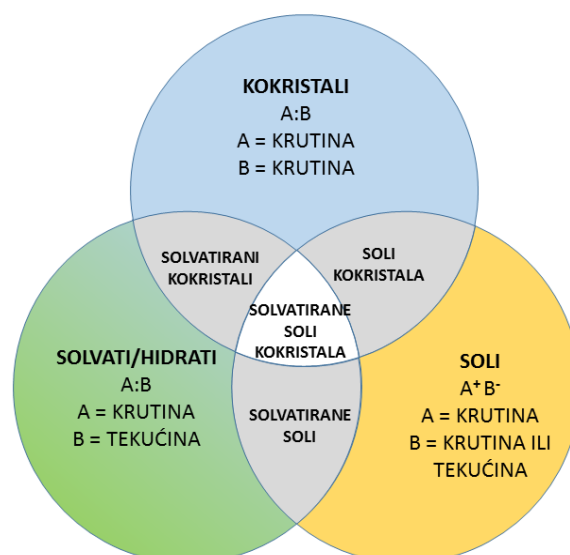
Kokristali se definiraju kao višekomponentni supramolekulski sustavi stabilizirani nekovalentnim interakcijama, najčešće vodikovim ili halogenskim vezama. Važno je da njihove nenabijene komponente mogu zasebno kristalizirati, što karakterizira kokristal kao vrstu kristalne forme. Specifično, kokristali API-a su kristalni kompleksi građeni od API-a s drugom farmakološki prihvatljivom ili GRAS (eng. *Generally Regarded As Safe*) molekulom. Uz to, dobri i prihvatljivi kokristalni sučinitelji (*kofomeri*, od eng. *Co-crystal formers* (CCF)) mogu biti npr. prehrambeni dodaci, konzervansi, vitamini, minerali, aminokiseline, biomolekule ili neke druge farmakološki aktivne molekule.^{7,8}

Prema prijedlogu klasifikacije kokristala farmakološki aktivnih tvari koja je donijela FDA treba vrijediti sljedeće:

1. Kokristal koji sadrži *kofomer* i farmakološki aktivnu tvar ne smatra se novom farmakološki aktivnom tvari.
2. Novi kristalni oblici lijeka moraju imati definirano područje prijenosa protona, kako bi se razlikovale soli od kokristala.
3. Kokristali moraju disocirati *in vivo* prije dolaska farmakološki aktivne molekule u aktivno mjesto.

4. Kokristali farmakološki aktivne tvari predstavljaju kemijski analog fizičkoj smjesi farmakološki aktivne tvari i dodataka.³

Priroda višekomponentnih krutina je takva da postoji značajno preklapanje u definiranju soli, kokristala i hidrata (Slika 5.), što uzrokuje probleme u njihovoj podjeli. Polazeći od te činjenice, neki autori smatraju da kokristali trebaju biti povezani sa solima zbog sličnosti u definiranju granica područja prijenosa protona, nekih mjerljivih fizikalnih svojstava u otopini kao što su konstanta topljivosti (K_s) i raspon pH vrijednosti pri kojima je kokristal stabilan te definirane stehiometrije.³

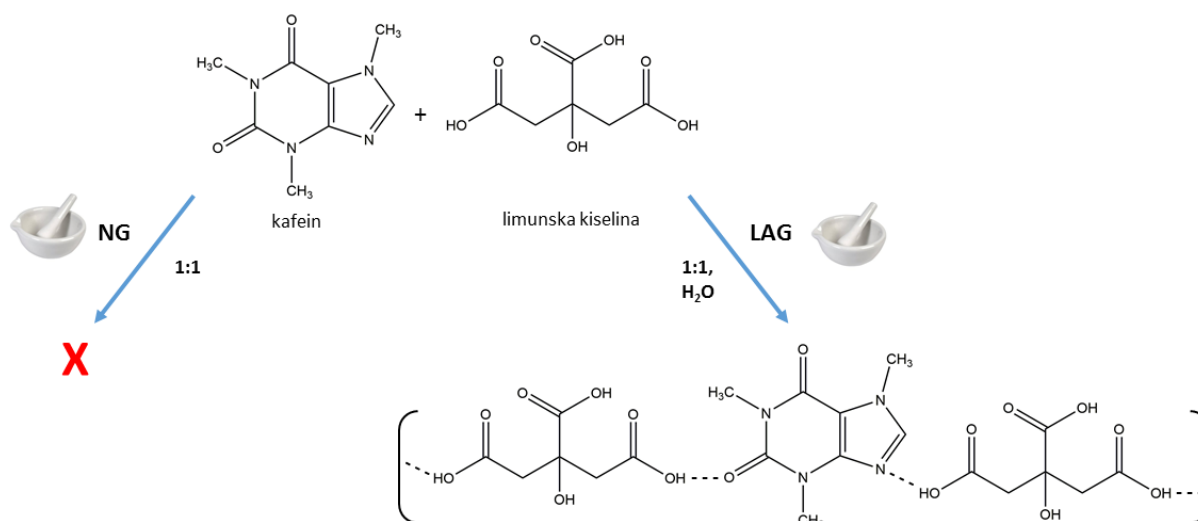


Slika 5. Podjela višekomponentnih kristalnih oblika.³

3.2. Načini dobivanja

Kokristali se mogu pripremiti slijedećim metodama: kristalizacijom iz otopine, mljevenjem reaktanata u čvrstom stanju, kristalizacijom iz taljevine, reakcijskom kristalizacijom te kristalizacijom iz suspenzije. U zadnjih petnaestak godina primijećen je značajan porast korištenja mehanokemijskih metoda za istraživanje kokristalizacije API-a, ali i tehnika koje koriste pare otapala: ubrzano starenje (eng. *accelerated aging*) i sinteza potpomognuta parama otapala (eng. *vapour digestion*).⁹. Mehanokemijske metode, kao što su mljevenje

potpomognuto malom količinom tekućine (eng. *liquid assisted grinding* (LAG)) i suho mljevenje (eng. *neat grinding* (NG)) pokazale su se uspješne u istraživanju novih polimorfa, novih soli i kokristala farmakološki aktivnih tvari, kao i u njihovom skaliranju kontinuiranim procesiranjem ili procesiranjem u serijama (eng. *continuous or batch processing*). LAG je obično bolja tehnika u usporedbi sa suhim mljevenjem jer su sintetizirani produkti veće kristalnosti. To se primjerice može potvrditi činjenicom da prilikom mljevenja kafeina i limunske kiseline (u množinskom omjeru 1:1) potpomognutim malom količinom tekućine nastaje jedan od mogućih kokristalnih produkta, dok prilikom suhog mljevenja ne nastaje očekivani kokristal (Slika 6.).^{1,8,9}



Slika 6. Usporedba rezultata različitih vrsta mljevenja kafeina i limunske kiseline (1:1).

Prednost ovih načina dobivanja kristalnih materijala nije samo u mogućnosti sinteze reaktivnih materijala ili materijala kojih je teško ili gotovo nemoguće dobiti iz otopine, nego i u tome što oni predstavljaju jedan od odgovora na zahtjeve farmaceutske industrije za čišću i efikasniju sintezu. To podrazumijeva smanjenje kemijskog otpada i uklanjanje nekih postupaka pročišćavanja. Ostale prednosti proizlaze iz mogućnosti bolje kontrole polimorfije i fizikalno-kemijskih svojstava mijenjanjem pojedinih parametara koji utječu na stvaranje kristala. To su npr. vrijeme mljevenja i starenja, množinski omjer reaktanata, veličina kuglica korištenih za vrijeme mljevenja, količina dodanog otapala kod mljevenja potpomognutog malom količinom tekućine, uvjeti relativne vlažnosti itd. Valja naglasiti da velik izazov za znanstvenike predstavlja slabo razumijevanje reakcijskog mehanizma kod ovih načina

dobivanja. Za razumijevanje je potreban interdisciplinarni pristup koji uključuje suradnju kemije materijala, kristalografije, spektroskopije i teorijske kemije.^{1,8,9}

3.3. Izučavanje strukture

Difrakcija rendgenskih zraka na jediničnom kristalu se dosad pokazala najboljom instrumentnom tehnikom za određivanje kristalne i molekulske strukture materijala. Međutim, ne mogu se uvijek sintetizirati kristali optimalne veličine i kvalitete. Čak i kad je jedinični kristal povoljne veličine i kvalitete, ne može se uvijek odrediti točan položaj vodikova atoma (prijenos protona s kiseline na bazu). Prema tome, kako bi se dobila potpunija slika kristalne i molekulske strukture nekog čvrstog uzorka, potrebno je tu tehniku kombinirati sa spektroskopskim tehnikama kao što su Ramanova spektroskopija, IR-spektroskopija i NMR (nuklearna magnetska rezonancija) u čvrstom stanju.⁴

Činjenicu da je najbolje uključiti razne tehnike za izučavanje strukture kristalnog uzorka može se ilustrirati na primjeru određivanja prijenosa protona i duljina vodikovih veza između heterocikličke farmakološki aktivne molekule Pfizer I⁴ i različitih dikarboksilnih kiselina. U izučavanju strukture takvog sustava koristila se difrakcija rendgenskih zraka na jediničnom kristalu u kombinaciji s ¹⁵N-NMR spektroskopijom u čvrstom stanju. Pripravljena su i okarakterizirana tri kiselobazna kompleksa: seskisukcinatni, dimalonatni i dimaleatni. Kristalni oblik produkata određen je iz duljina vodikovih veza analizom dobivene kristalne i molekulske strukture. Dobiveni rezultati odgovarali su jednoj kokristalnoj formi (seskisukcinatni), miješanom ionskom kompleksu (dimalonatni) i jedne dvosoli (dimaleatni). Rezultati su potvrđeni uspoređivanjem ¹⁵N kemijskih pomaka na svakoj vrsti slobodne baze. Mali pomaci, usporedno sa pomakom slobodne baze, odgovarali su seskisukcinat kokristalu, dok su veći pomaci, koji odgovaraju potpunoj protonaciji, odgovarali preostalim formama. Dodatno je potvrđeno da IR-spektroskopija može biti jako korisna u detektiranju nastajanja kokristala, npr. ako je kao *koformer* korištena karboksilna kiselina mogu se uočiti istezanja karakteristična za karboksilnu skupinu (istezanje C=O veze oko 1700 cm⁻¹ i istezanje C–O oko

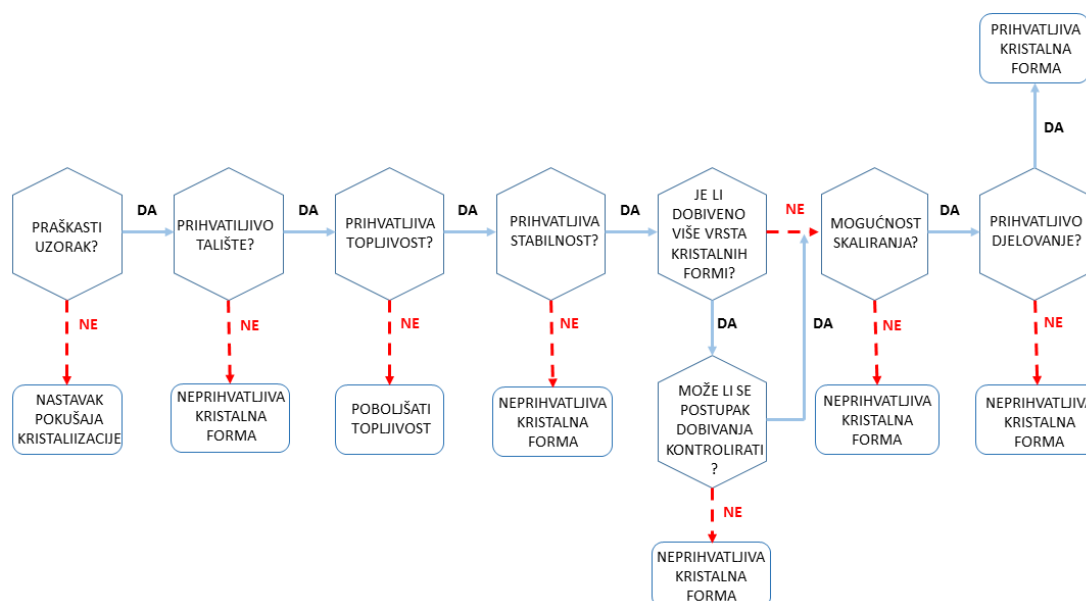
1200 cm^{-1}), a ako je između kiseline i baze prisutna $\text{O-H}\cdots\text{N}$ vodikova veza mogu se uočiti dvije široke vrpce istezanja oko 2450 cm^{-1} i 1950 cm^{-1} .⁴

Sve ranije spomenute tehnike izučavanja strukture i njihove kombinacije pomažu pri razlikovanju kokristala od soli farmakološki aktivnih tvari, no treba napomenuti da u nekim slučajevima razlikovanje te dvije kristalne forme može biti iznimno zahtjevno. Također, iako koristali i soli najčešće posjeduju različita fizikalna svojstva (npr. stabilnost i topljivost u otopini), problem razlikovanja soli i kokristala tijekom razvoja ne mora biti toliko značajan ukoliko se proces sinteze odgovarajućeg kristalnog oblika pomno prati i regulira. Međutim, takav problem je iznimno važan u zakonodavstvu i za šticeenje intelektualnog vlasništva, kao što je ranije spomenuto u poglavlju 3.1.^{4,7}

3.4. Fizikalno-kemijska svojstva

Iako soli povećavaju bioraspoloživost farmakološki aktivnih tvari, više od 30% farmaceutskih komponenata nema optimalne funkcionalne skupine potrebite za nastajanje soli. Sa termodinamičkog gledišta, kokristali API-a su stabilni i visokoenergetski sustavi. Zbog toga, priprava kokristala može potencijalno poboljšati topljivost, brzinu otapanja, stabilnost i higroskopnost farmakološki aktivnih tvari.⁷

Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava (kao što su mjera kristalnosti, talište, topljivost, konstanta stabilnosti u otopini i sl.) bitno je u ranijoj fazi istraživanja novih formi kokristala. Informacije dobivene ispitivanjem tih svojstava mogu biti upotrijebljene za odabir povoljnih formi kokristala, dobrih kandidata za lijek. Primjer postupka odabira prihvatljive forme kokristala koji metodom pokušaja i pogreške dovodi do odabira najpovoljnije forme lijeka prikazuje Slika 7. Takvog se postupka ne treba strogo držati, već ga se treba koristiti kao pomoć zbog činjenice da svaka molekula koja gradi kokristal posjeduje vlastite zapreke i izazove.⁴



Slika 7. Shematski prikaz primjera odabira najpovoljnijeg kristalnog oblika lijeka.⁴

3.4.1. Talište kokristala

Postavlja se sljedeće pitanje: „Mijenja li se talište kokristala s obzirom na komponente kokristala i može li se talište procijeniti za seriju kokristala?“

Talište je jedno od temeljnih fizikalnih svojstava koje je određeno temperaturom na kojoj je kruta faza u ravnoteži sa tekućom. Prijelaz krutine u tekućinu je termodinamički proces u kojem je promjena slobodne Gibbsove energije prijelaza jednaka nuli. Vrijednost temperature taljenja je određena omjerom promjene entalpije i entropije taljenja. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC, od eng. *differential scanning calorimetry*) je pogodnija tehnika za prikupljanje podataka o temperaturi taljenja u usporedbi sa standardnom tehnikom ili Kofler-ovom metodom jer je moguće istovremeno prikupiti podatke o entalpiji taljenja. Podaci iz DSC dijagrama o temperaturi i entalpiji taljenja omogućuju razvrstavanje polimorfa kokristala na one koji su u monotropnom i na one koji su u enantiotropnom odnosu.⁴

Određivanje tališta se uobičajeno provodi kako bi se odredila čistoća konačnog produkta. U farmaceutskoj industriji, njegovo određivanje je vrlo važno i radi povezanosti s topljivošću uzorka u otopini i s tlakom para. Naime, temperatura taljenja je direktno povezana s topljivošću tvari uz određene pretpostavke koje se odnose na entalpiju taljenja.

Prema tome, mogućnost predviđanja tališta nekog određenog kokristala farmakološki aktivne tvari prije nego li je sintetiziran bila bi korisna zbog prilagođavanja njegove topljivosti prema praktičnoj primjeni. S druge strane, uzimajući u obzir sve strukturne faktore koji utječu na talište kristala, od pakiranja molekula, odgovarajuće simetrije, međumolekulskih interakcija, do konformacijskih stupnjeva slobode molekule, nije moguće jednostavno povezati kemijsku strukturu direktno s temperaturom taljenja. Prema podacima do 2009. godine zabilježeno je da se temperatura taljenja u 39% slučajeva smanjuje kokristalizacijom, dok u 51% slučajeva poprima vrijednost između temperature taljenja API-a i *koformera*.

3.4.2. Stabilnost kokristala

Pitanje koje se treba postaviti glasi: „Može li se kemijska i fizikalna stabilnost farmakološki aktivne tvari poboljšati kokristalizacijom?“

Tijekom ispitivanja stabilnosti kokristala moraju se ispitati sve moguće vrste stabilnosti ovisno o njegovoj molekulskoj strukturi i svojstvima. Prikupljanje podataka o kemijskoj i fizičkoj stabilnosti odvija se pri tzv. „uvjetima ubrzane provjere stabilnosti“ kako bi se odredilo vrijeme raspada kokristala i rok trajanja. Kod takvog procesa bitnu ulogu ima količina vode koja sudjeluje ili se apsorbira tijekom raspada. Određena količina vode prisutna u kokristalu može dovesti do promjene forme, razlaganja ili drugih posljedica. Također, bitnu ulogu u ispitivanju stabilnosti kokristala imaju otpornost na temperaturne promjene i stabilnost u otopini.⁴

- 1) **Stabilnost pri određenim uvjetima relativne vlažnosti** – Pri ispitivanju stabilnosti kokristala od velike važnosti su fizikalne i kemijske promjene u širokom rasponu relativne vlažnosti zraka. Koriste se tehnike automatiziranog kruga apsorpcije/desorpcije vlage pomoću kojih se otkrivaju problematična područja u kokristalu. Ispitivanja se najčešće provode u komorama različitih uvjeta vlažnosti (najčešće: 0, 43, 75, 98 % RH) tijekom određenog perioda vremena. Nakon toga slijedi detaljnija analiza uzoraka. Uvjeti vlažnosti određuju se prema informacijama o području gdje će se taj lijek konzumirati, odnosno o klimi ili geografskoj širini.⁴

2) **Otpornost na temperaturne promjene** - Otpornost kokristala na temperature promjene je još jedno važno svojstvo koje je utemeljeno na uvjetima ubrzane provjere stabilnosti. U današnje vrijeme, ima jako malo istraživanja koja se bave ovom tematikom. Jedno od takvih istraživanja bavilo se proučavanjem kokristala monofosfatne soli sa fosfatnom kiselinom tijekom osam tjedana. Kokristal je izlagan temperaturi od 60 °C i nije primijećen njegov raspad ili moguća promjena forme. Druga dva istraživanja bavila su se interpretacijom podataka iz DSC dijagrama i učinka promjene temperature na stabilnost. Promatrani sustavi bili su paracetamolni kokristali 4,4'-bipiridina, 1,4-dioksana, N-metilmorfolina, morfolina, N,N'-dimetilpiperazina i piperazina. Kokristal paracetamola i 4,4'-bipiridina se jedini pokazao stabilnim tijekom postupka zagrijavanja, dok su se ostali razlagali na komponente uz promjenu kristalne rešetke paracetamola u monoklinsku. Ovakve vrste ispitivanja su vrlo korisne i trebaju se provoditi u kombinaciji s drugim postupcima. Informacije o visokotemperaturnim promjenama mogu pomoći pri rješavanju problema stabilnosti tijekom dužeg vremenskog perioda, kao i pri izbjegavanju raspada prilikom sušenja.⁴

3) **Kemijska stabilnost** - Obzirom da kokristali mogu biti izloženi nepovoljnim uvjetima, procjenjivanje kemijske stabilnosti API-a u prisutnosti nekog dodatka već u ranoj fazi formulacije lijeka može pridonijeti razvoju kvalitetnijeg i stabilnijeg kristalnog materijala. To se može ilustrirati na primjeru uspoređivanja kemijske stabilnosti kokristala karbamazepina i saharina u množinskom omjeru 1:1, i čistog karbamazepina. Ispitivanje se provodilo više od dva mjeseca na temperaturama 40 °C i 60 °C te pri uvjetima relativne vlažnosti zraka 40 °C/75 % RH i 25 °C/60 % RH. Oba materijala pokazala su sličan obrazac degradacije pri različitim uvjetima. Dakle, navedeni kokristal i čisti karbamazepin su se pokazali jednako stabilnim u ispitivanim uvjetima.⁴

- 4) **Stabilnost u otopini** - Pojam stabilnosti u otopini definira sposobnost molekulskog kompleksa da postoji u otopini. Zbog činjenice da kokristal može disocirati u mediju u kojem se nalazi npr. voda, želučana kiselina, puferske otopine i sl., stabilnost i prisutnost molekulskog kompleksa u otopini je jedno od važnijih svojstava koje se uzima u obzir u razvoju željenog materijala. Stabilnost u otopini treba procijeniti, ne samo za otopine i suspenzije, već i za krutine koje se razlažu u probavnom sustavu. U većini slučajeva, eksperimenti koji se bave ispitivanjem stabilnosti u otopini su u kombinaciji sa drugim eksperimentima koji se odnose na topljivost i disocijaciju u otopini.⁴

3.4.3. Topljivost kokristala

Sljedeće pitanje koje se postavlja: „Može li se topljivost farmakološki aktivne tvari promijeniti kokristalizacijom?“

Jedan od glavnih razloga za istraživanje kokristala u farmaceutskoj industriji je povećanje topljivosti slabo topljivih komponenti lijekova. Veća topljivost je poželjna u probavnom sustavu jer duže vrijeme otapanja rezultira slabijom apsorpcijom lijeka. Vrijeme potrebno za postizanje ravnotežne topljivosti također je ključan faktor u razvoju potencijalne kokristalne forme lijeka s obzirom na vremenski period u kojem je lijek prisutan u želucu i crijevima. To se može dokazati analizom krivulje topljivosti, prema podacima o koncentraciji otopine. Za određivanje ravnotežne topljivosti, potrebno je uzeti u obzir veći broj izmjerenih podataka kako bi se potvrdilo postizanje ravnoteže. Brzina otapanja lijeka ovisi i o veličini čestica od koje se sastoji kristal. Uz to moguće međusobne pretvorbe kristalnih formi također utječu na brzinu otapanja lijeka, odnosno otapanje ovisi o njihovoj stabilnosti u otopini.

Tablica 1. Usporedba topljivosti različitih kristalnih oblika farmakološki aktivnih tvari.⁴

API	Koformer	Kristalni	Topljivost	Otapalo
			mg/mL	
norfloksacin	–	–	0,21	voda
	izonikotinamid	kokristal	0,58	
	jantarna kiselina	sol	6,60	
	malonska kiselina	sol	3,90	
	maleinska kiselina	sol	9,80	
			μmol/mL	
Pfizer I	–		0,0008	voda
	seskvisukcinat	kokristal	0,79	
	dimalonat	miješani ionski kompleks	3,83	
	dimaleat	dvosol	10,4	
			mg/mL	
piroksikam	–	–	<0,001	voda
	saharin	kokristal	<0,001	
lamavidun	–	–	70,00	voda
	saharin	sol	10,56	

Za neutralne molekule, kokristalizacija može povećati opseg izbora optimalnog kristalnog oblika lijeka utjecajem na topljivost. Podaci o topljivosti koji su sakupljeni tijekom eksperimenta ne moraju odgovarati samo polaznoj formi zbog mogućih pretvorbi. Postoji mnogo istraživanja koja se bave ispitivanjem topljivosti kokristala u različitim medijima, uključujući vodu, 0,1 M HCl, fosfatni pufer, simuliranu želučanu kiselinu (SGF) i simulirane crijevne tekućine (SIF). U većini istraživanja se analizira topljivost praha u više vremenskih točka. U nekim slučajevima veličina čestica je kontrolirana, u nekima nije, a u mnogim istraživanjima su za međusobne usporedbe korištene različite veličine čestica. Navedeno ukazuje na širok raspon eksperimentalnih varijabli u ispitivanju topljivosti. Za slabo topljive komponente, pogotovo ako nemaju ionizirajuće vrste, poželjno je pokušati sintetizirati kokristal kako bi se utvrdila mogućnost postojanja poboljšanog oblika lijeka. U slučaju uspoređivanja kokristala i soli, primijećen je trend u kojem su soli topljiviji oblici lijeka nego

kokristali, kao što je prikazano u Tablici 1. No, potrebno je provesti veći broj ispitivanja kako bi se utvrdio takav obrazac.⁴

3.4.4. *Intrinzično otapanje kokristala*

„Poboljšava li se brzina otapanja kokristalizacijom usporedno s brzinom otapanja individualnih farmakološki aktivnih tvari?“

Kod ispitivanja intrinzičnog otapanja mjeri se brzina otapanja tvari bez utjecaja veličine čestica. To se postiže stlačivanjem u disk ili kuglicu, obično koristeći Wood-ov aparat u posudi za otapanje. Koncentracija u otopini mjeri se tijekom vremena kako bi se odredila brzina otapanja (u $\text{mg cm}^{-3} \text{ min}^{-1}$). Disk mora ostati netaknut tijekom trajanja eksperimenta, tako da je kompresijski tlak kritičan za slabo topljive prahove. Također je vrlo bitno da ne dolazi do promjene forme tijekom stlačivanja u disk ili tijekom eksperimenta. Nakon završetka eksperimenta, analizom difraktograma rendgenskih zraka u polikristalnom uzorku može se utvrditi je li došlo do promjene forme uzorka.⁴

Postoji mali broj istraživanja koja se bave ovom tematikom, no može se izdvojiti par primjera koji ilustriraju učinak različite intrinzične topljivosti. Podaci koji se odnose na intrinzičnu topljivost kokristala glutenske kiseline i 2-[4-(4-kloro-2-fluoropentoksi)fenil] pirimidin-4-karboksamida u vodi sakupljeni su 90 minuta. Njihovom analizom pokazano je kako je otapanje kokristala 18 puta brže od otapanja samih komponenata kokristala. Difraktogrami rendgenskih zraka u polikristalnom uzorku jasno upućuju kako nije došlo do značajnije promjene forme tijekom eksperimenta. U sljedećem primjeru razmatrano je intrinzično otapanje kokristala fluoksetin hidroklorida sa tri različite kiseline u vodi. Otapanje kokristala u kojem je množinski omjer jantarne kiseline i fluoksetin hidroklorida 1:2 bilo je prebrzo za točno mjerenje brzine otapanja. Brzina otapanja kokristala benzojeve kiseline i fluoksetin hidroklorida bila je manja nego od same farmakološki aktivne molekule, dok je brzina otapanja kokristala fumarne kiseline i fluoksetin hidroklorida bila skoro pa identična brzini otapanja samog fluoksetin hidroklorida. Ti rezultati pokazuju kako kokristalizacija može, ali i ne mora poboljšati brzinu otapanja. Naprotiv, može ju čak i pogoršati.⁴

3.4.5. Bioraspoloživost kokristala

„Može li se bioraspoloživost farmakološki aktivne tvari poboljšati kokristalizacijom?“

Bioraspoloživost opisuje mjera brzine i područje širenja aktivnog lijeka koji kruži u organizmu. U ispitivanjima koja se bave ovim područjem koriste se glodavci, psi, svinje i primati (npr. majmuni i lemuri). Ona se obično odvijaju tijekom ranog razvoja lijeka i na manjoj grupi životinja (od četiri do šest jediniki) kako bi se utvrdili farmakokinetički podaci o novo sintetiziranoj formi. Ispitivanja na kokristalima i njihovim komponentama daju direktni uvid u razliku u bioraspoloživosti. Ona se temelje na mjerenju količine lijeka u krvi nakon analize mokraće životinja. Uzorci krvi se analiziraju nakon doziranja kako bi se istražila apsorbirana količina lijeka tijekom vremena. Lijek se može unijeti u organizam na više načina, najčešće oralno. To podrazumijeva formulaciju lijeka kao praha u kapsuli, praha i dodatka u kapsuli ili kao tekućine (otopine ili suspenzije). Važno je razlikovati otopine od suspenzija jer otapanje krutine u otopini može značajno poboljšati bioraspoloživost, dok je za suspenzije potrebno imati informacije koliko je točno komponenti kokristala otopljeno kako bi se odredio efekt na rezultate ispitivanja.⁴

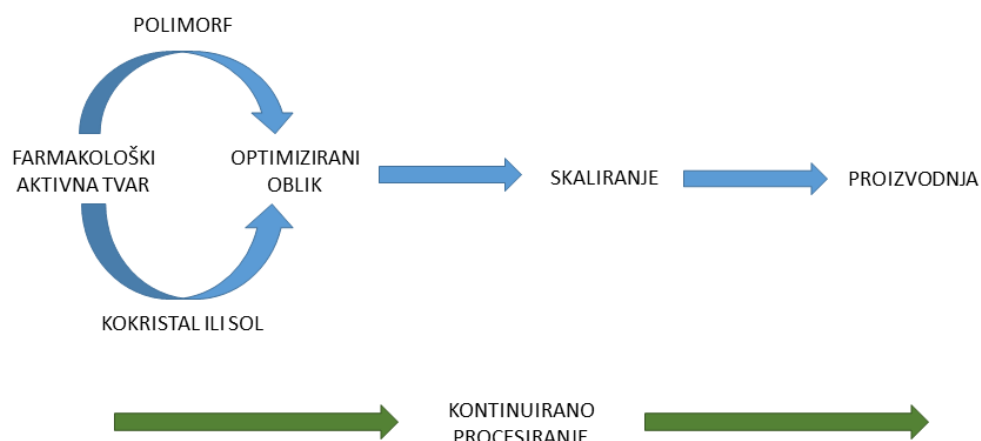
Ispitivanjem bioraspoloživosti kod štakora za kokristal AMG-517 i sorbinske kiseline u množinskom omjeru 1:1 te samog AMG-517, pronađeno je kako je efekt bioraspoloživosti doze kokristala od 30 mg/kg usporediv sa efektom bioraspoloživosti doze samog AMG-517 od 500 mg/kg. Ovo je primjer u kojem je nađeno da kokristal disocira u simuliranim crijevnim tekućinama, i pokazano je da je više topljiv od pojedinačnih komponenti prije disocijacije.⁴

Iako zasad postoji mali broj istraživanja koji se bave ispitivanjem bioraspoloživosti kokristala, kokristali mogu značajno povećati bioraspoloživost slabo topljivih komponenti. Ne postoje uvijek *in vitro/in vivo* poveznice u ovim ispitivanjima. Postoje i primjeri ispitivanja disociranih kokristala *in vitro* koji pokazuju poboljšanje u ispitivanju na životinjama.^{4,7}

3.5. Problemi, izazovi i razvoj

Ovo poglavlje se dotiče važnih problema i izazova koje kristalizacijski postupci predstavljanju u znanosti i industriji, kao i njihovih mogućih budućih rješenja. U to spadaju problemi nukleacije, skaliranja i razvoja novih načina procesiranja kristalnih materijala (Slika 8.). Dakako, postoji puno drugih bitnih problema s kojima se susreće proces razvoja novog lijeka, kao npr. ranije spomenuti problemi polimorfije kokristala i intelektualnog vlasništva, no u daljnjem tekstu dan je naglasak na prethodno navedenim.

Kristalizacija je važan postupak odvajanja i pročišćavanja u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji koji se primjenjuje na širokom rasponu materijala. Kontrola veličine kristala, njegova oblika i kristalne forme je odlučujuća jer ti faktori mogu utjecati na postupke filtracije, sušenja i mljevenja, kao i na ranije objašnjena fizikalno-kemijska svojstva. Kristalizacija je kao postupak odvajanja međuprodukata reakcija važna za farmaceutsku industriju i obično služi kao završni korak u sintezi novih farmakološki aktivnih tvari.⁷



Slika 8. Shematski prikaz postupka proizvodnje kristalnog oblika lijeka.⁷

3.5.1. Napredak u razumijevanju osnova nukleacije

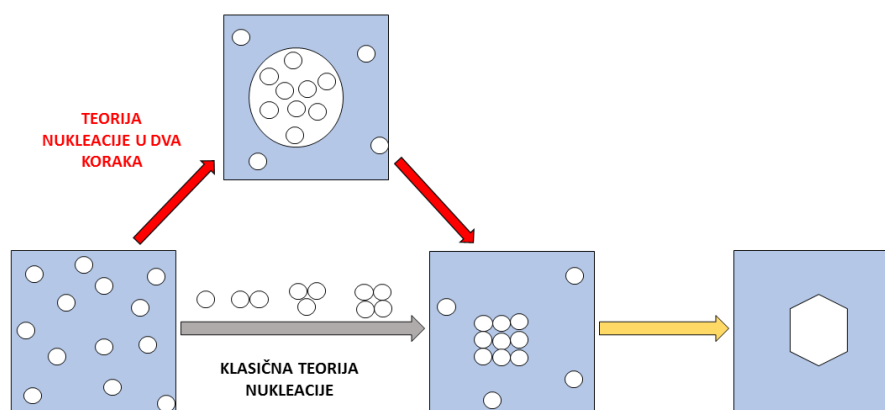
Nukleacija ima odlučujuću ulogu u određivanju dobivene kristalne forme i u raspodjeli veličine kristala (eng. *crystal size distribution*). Prema tome, razumijevanje osnova nukleacije presudno je za kontrolu kristalizacijskih procesa. Glavni cilj znanstvenika je razvoj točnog opisa rezultata procesa nukleacije, obzirom na činjenicu da se veličina osnovne jedinice

nukleacije kreće u rasponu od 10 do 1000 molekula, i obzirom na vrijeme potrebno za nastajanje te osnovne jedinice koje se kreće u rasponu od manje od sekunde do nekoliko dana. Te činjenice predstavljaju veliki izazov za eksperimentalne i računalne tehnike.⁷

Danas postoje dvije teorije koje se koriste za opis nukleacije: klasična teorija i teorija nukleacije u dva koraka (Slika 9.). Klasična teorija je jednostavna i široko korištena, no ne i sasvim točna. Govori kako povećavanjem veličine sustava, ukupna slobodna Gibbsova energija (ΔG) doseže maksimum za određenu kritičnu veličinu sustava (r_c), nakon čega se smanjuje daljnjim porastom veličine sustava. To ukazuje da rast tada počinje biti energetski povoljan. U ovoj teoriji postoji nekoliko aproksimacija koje uzrokuju odstupanje rezultata teorije od rezultata eksperimenata:

- Kritična jezgra aproksimira se sferom određenog polumjera r (nije dobra aproksimacija za veličinu jezgre od nekoliko nm)
- Rast sustava odvija se adicijom po jedne jezgre u svakom koraku
- Molekule u jezgri uređene su u strukturu analognu strukturi konačnog kristala
- Koristi se samo kriterij veličine za odlučivanje o kritičnosti sustava (to nije adekvatno za kristalizaciju iz otopine - potrebni su dodatni parametri gustoće i periodičnosti)

No, postoji i alternativni mehanizam nukleacije gdje su fluktuacije u strukturi određene fluktuacijama u gustoći kristala i ne moraju se dogoditi simultano. To je glavna ideja teorije nukleacije u dva koraka. Ispitivanja koja su koristila mikroskopiju sa diferencijalnim interferiranim kontrastom, dinamičko i statičko raspršenje zračenja, DSC i raspršenje rendgenskog zračenja dokazala su valjanost teorije nukleacije u dva koraka na molekulama poput proteina, koloidnih čestica i malih organskih molekula. Pokazano je da se fluktuacije u strukturi odvijaju u području veće gustoće molekula na neko određeno vrijeme zbog pojava fluktuacija u gustoći.⁷



Slika 9. Prikaz klasične teorije nukleacije i teorije nukleacije u dva koraka.⁷

Mnoga ispitivanja u prošlom desetljeću podržavaju teoriju nukleacije u dva koraka. Međutim, razumijevanje njenog mehanizma, pogotovo drugog koraka, još uvijek je vrlo skromno. Postoji jako malo informacija o reorganizaciji molekula prisutnih u gustim kapljicama otopine. Kao ograničavajući korak brzine nukleacije uvodi se organizacijski korak koji kaže da se povećanjem složenosti sustava molekula produljuje vrijeme nukleacije. Razlog tome je veći konformacijski stupanj slobode molekula čime se molekule teže organiziraju u pogodnu kristalnu rešetku. Buduća istraživanja usmjerena su prema dokazivanju ove teorije. Simulacije predstavljaju obećavajući način prikupljanja mikroskopskih informacija o procesu restrukturiranja molekula. No, osim jednostavnijih parametara poput broja čestica i reda veza, koji karakteriziraju veličinu i strukturu nakupina molekula, potrebni su i složeniji parametri kako bi se mogli razlikovati rezultati u otopini i kristalu. Razvoj robustnih kristalizacijskih procesa u kojima se može kontrolirati i/ili predvidjeti raspodjela veličine kristala te polimorfija zahtijevaju jasnu sliku mehanizma nukleacije. Iako su istraživanja još uvijek daleko od tog cilja, opaža se napredak u razumijevanju mehanizma u zadnjih desetak godina, kao i veći broj istraživačkih skupina koje se bave tim područjem.⁷

3.5.2. *Proizvodnja većih količina kokristalnog materijala*

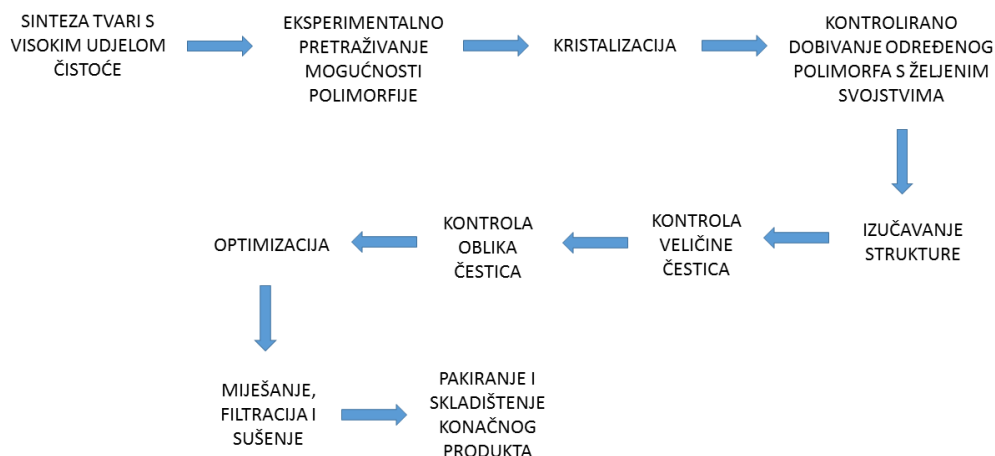
Kako bi se proizvodnja kokristalnih materijala preusmjerila sa znanstvenih eksperimenata na veće industrijske procese (od 1 kg na dalje), postupci koji su karakterizirani visokom čistoćom sintetiziranih kokristala i njihovim visokim prinosom prvenstveno moraju biti otkriveni i

dobro ispitani. Različite količine kokristala se obično proizvode ovisno o njihovoj strukturi i/ili o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima (topljivost, bioraspoloživost i sl.). Pokazano je da su tehnike mljevenja i sporog isparavanja otapala iz otopine dva najčešće korištena načina dobivanja kristala. Međutim, ove tehnike posjeduju bitna ograničenja za proces skaliranja kristala na veće količine te se zato moraju pronaći drugačiji načini za njegovo odvijanje.^{4,7}

Kod procesa skaliranja kokristala farmakološki aktivnih tvari potrebno je uzeti u obzir nekoliko bitnih faktora:

- a) Stabilnost konačne forme farmakološki aktivnih tvari
- b) Vrijeme skaliranja
- c) Entalpija stvaranja
- d) Miješanje otopina
- e) Filtracija
- f) Centrifugiranje
- g) Sušenje
- h) Održavanje temperature, pH, količine vlage i drugih parametara
- i) Isplativost

Navedeni faktori određuju uspješnost proizvodnje većih količina kokristalnog materijala. Gotovo svi procesi razvijeni u laboratoriju ovisni su o procesu skaliranja radi njihove primjene u industriji. Razlog tome je što se materijali koji uključuju farmakološki aktivne tvari ponašaju drugačije u malim količinama (u laboratoriju) i na većoj skali – od kilograma do tone (u industriji). Zato je proces skaliranja kokristala farmakološki aktivnih tvari (Slika 10.) velik izazov u farmaceutskoj industriji. Dodatne izazove predstavljaju mogućnost promjene njihovih optimiziranih svojstava, obnovljivost i isplativost. Stoga je glavni cilj pokušati odgonetnuti način kako skalirati produkte jednolike kvalitete po pitanju čistoće kristala, raspodjele veličine kristala, oblika i kristalne forme.



Slika 10. Shematski prikaz optimiziranog postupka skaliranja željenog polimorfa.⁷

3.5.3. Kontinuirano procesiranje

Većina industrijskih procesa kristalizacije odvija se procesiranjem u serijama bilo kristalizacijom potpomognutom hlađenjem, dodatkom protuotapala ili reakcijskom kristalizacijom. Usprkos tome što je to najčešće korišten način kristaliziranja na industrijskoj skali, postoji i alternativni način koji, iako vrlo zahtjevan za razvoj, nudi određene prednosti pred procesiranjem u serijama. Taj način se naziva kontinuirano procesiranje.⁷

Kontinuirano procesiranje po svojoj prirodi zahtjeva bitno manju opremu, stoga su i troškovi opreme manji. Na primjer, ako se pretpostavi da se godišnje treba proizvesti 16 tona nekog određenog kokristala farmakološki aktivne tvari, oprema za kontinuirano procesiranje bi obično zahtijevala reaktor od 250 litara, dok bi za procesiranje u serijama bilo potrebno koristiti reaktor od 5000 litara. Također, kontinuirano procesiranje nudi bolju kontrolu fizikalnih svojstava kristalnih materijala. Jednom kada se postigne ustaljeno stanje, svi materijali kristaliziraju pod jednakim uvjetima, što vodi boljoj reproduktivnosti i kontroli/prilagođavanju ključnih karakteristika kao što su raspodjela veličine kristala i polimorfija. Proizvodnja jednolikih produkata tijekom procesiranja omogućuje eliminaciju većine postupaka ispravljanja pogrešaka čime se smanjuju troškovi i vrijeme procesiranja. Na primjer, uklanjanje postupka granulacije (sa otapalom ili bez otapala) koji se koristi za proizvodnju 'jednakih' veličina čestica za stvaranje određene kristalne doze lijeka. Usporedno s procesiranjem u serijama, kontinuirano procesiranje je dokazano bolja tehnika za

povećavanje bioraspoloživosti lijeka. Razlog tomu je manja mogućnost promjene konačne forme krutog produkta, kao i manja mogućnost njegovog razlaganja zbog stalne proizvodnje malih čestica sa jasnom raspodjelom veličine. Usprkos tome, u većini slučajeva procesiranje u serijama postiže veći prinos u odnosu na kontinuirano procesiranje jer ondje tvari dostižu ravnotežno stanje, dok se kontinuirano procesiranje zasniva na ustaljenom stanju. Međutim, moguće je prinos kontinuiranog procesiranja barem izjednačiti sa prinosom procesiranja u serijama razvijanjem prihvatljivog sustava obnavljanja.⁷

Iako postoje primjeri u industriji koji ukazuju na prednosti ove tehnike, primjena kontinuiranog procesiranja u farmaceutskoj industriji je izuzetno spora. Razlog tomu su problemi s kojima se suočava ova tehnika po pitanju malih količina produkata potrebnih u farmaceutskoj industriji, povezanosti ove tehnike s ostalima procesima (npr. s filtracijom), problema začepjenja sitnih dijelova aparature kristalima i na kraju sa pitanjima regulativnih propisa.⁷

§ 4. Zaključak

Uzevši u obzir sve činjenice, kokristali farmakološki aktivnih tvari su u današnje vrijeme u farmaceutskoj industriji postali jedan od važnijih kristalnih formi pri formulaciji i proizvodnji lijekova. Na temelju skromnog broja istraživanja mogu se donijeti nepotpuni zaključci, čime se naglašava važnost danjeg ulaganja u razvoj ovog područja. To se ponajviše odnosi na ispitivanje fizikalno-kemijskih svojstva kokristalnih materijala, polimorfije, razumijevanje reakcijskog mehanizama dobivanja kokristalnih materijala navedenim tehnikama te razvoja postupaka za proizvodnju većih količina kokristalnih materijala. Napredak u razumijevanju kemijske veze, predviđanja kristalne strukture i razvoja supramolekulske kemije će omogućiti bolje razumijevanje pojave polimorfije te kontrole kristalizacije. Stoga, tijekom faze razvoja optimalnih kokristalnih formi lijeka, veći naglasak treba biti usmjeren na razumijevanje i karakteriziranje njihovih faznih dijagrama te na razvoj robustnih procedura koje obuhvaćaju procese skaliranja.^{1,7}

§ 5. Literaturna vrela

1. D. Tan, L. Loots, T. Friščić, *Chem. Commun.* (2016) 1-23.
2. D. Braga, F. Grepioni i L. Maini, *Chem. Commun.* **46** (2010) 6232–6242.
3. S. Aitipamula, R. Banerjee, A. K. Bansal, K. Biradha, M. L. Cheney, A. R. Choudhury, G. R. Desiraju, A. G. Dikundwar, R. Dubey, N. Duggirala, P. P. Ghogale, S. Ghosh, P. K. Goswami, N. R. Goud, R. R. K. R. Jetti, P. Karpinski, P. Kaushik, D. Kumar, V. Kumar, B. Moulton, A. Mukherjee, G. Mukherjee, A. S. Myerson, V. Puri, A. Ramanan, T. Rajamannar, C. M. Reddy, N. Rodriguez-Hornedo, R. D. Rogers, T. N. G. Row, P. Sanphui, N. Shan, G. Shete, A. Singh, C. C. Sun, J. A. Swift, R. Thaimattam, T. S. Thakur, R. K. Thaper, S. P. Thomas, S. Tothadi, V. R. Vangala, N. Variankaval, P. Vishweshwar, D. R. Weyna, M. J. Zaworotko, *Cryst. Growth Des.* **12** (2012) 2147–2152.
4. N. Schultheiss, A. Newman, *Cryst. Growth Des.* **9** (2009) 2950–2967.
5. D. Braga, F. Grepioni, *Chem. Commun.* (2005) 3635–3645.
6. <http://www.imc.cas.cz/nmr/projekt/ws/springer.pdf> (preuzeto 28. svibnja 2016. god.)
7. J. Chen, B. Sarma, J. M. B. Evans, A. S. Myerson, *Cryst. Growth Des.* **11** (2011) 887–895
8. S. L. James, C. J. Adams, C. Bolm, D. Braga, P. Collier, T. Friščić, F. Grepioni, K. D. M. Harris, G. Hyett, W. Jones, A. Krebs, J. Mack, L. Maini, A. G. Orpen, I. P. Parkin, W. C. Shearouse, J. W. Steed, D. C. Waddelli, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 413-447.
9. Xiaozhi L., *Nature* **524** (2015) 20-21.